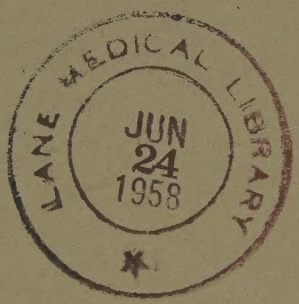
Leiden 1957

ENTING VAN MOLA HYDATIDOSA EN CHORIONEPITHELIOMA OP DE VRUCHTVLIEZEN VAN HET KIPPEËMBRYO



J. H. N. VAN BOUWDIJK BASTIAANSE

ENTING VAN MOLA HYDATIDOSA EN CHORIONEPITHELIOMA OP DE VRUCHTVLIEZEN VAN HET KIPPEËMBRYO

ENTING VAN MOLA HYDATIDOSA EN CHORIONEPITHELIOMA OP DE VRUCHTVLIEZEN VAN HET KIPPEËMBRYO

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS DR P. A. H. DE BOER
HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE
TE VERDEDIGEN
OP WOENSDAG 22 MEI 1957 TE 16 UUR
DOOR

JAN HENDRIK NICOLAAS VAN BOUWDIJK BASTIAANSE
GEBOREN TE NOORDWIJKERHOUT IN 1916

JOH. ENSCHEDÉ EN ZONEN
HAARLEM

PROMOTOR:

PROF. DR J. D. VERLINDE

Dit proefschrift werd bewerkt in de afdeling voor bacteriologie en experimentele pathologie van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde te Leiden.

INLEIDING

In 1951 vermeldde De Ruyck,[1] dat een bacterievrij filtraat van een suspensie van mola hydatidosa en van chorionepithelioom na enting op de chorioallantoïs en in de amnionholte van bevruchte kippeëieren bepaalde afwijkingen van de eivliezen deed ontstaan. Door serie-overentingen in eieren konden deze afwijkingen steeds weer opgewekt worden. De onderzoeker meende dan ook op grond hiervan, alsmede op grond van de bacteriologische steriliteit van het materiaal en de electronen-microscopische waarneming van op virusdeeltjes gelijkende lichaampjes, dat zowel de mola hydatidosa als het chorionepithelioom het gevolg zouden zijn van besmetting met een virus. Indien deze waarnemingen zouden kunnen worden bevestigd, zou dit onderzoek een geheel nieuw, en onverwacht, licht werpen op de aetiologie van de mola hydatidosa en het chorionepithelioom.

Het doel van de in dit proefschrift beschreven studie was dan ook in de eerste plaats de door De Ruyck behaalde resultaten zo mogelijk te bevestigen en vervolgens te trachten door middel van virologisch en serologisch onderzoek een bijdrage te leveren tot de diagnostiek.

[1]) R. de Ruyck (1951) Bull. du Cancer *38*, 52
R. de Ruyck (1951) Bull. du Cancer *38*, 252

I. HET ONDERZOEK VAN DE RUYCK

Uitgaande van de gedachte, dat mola hydatidosa als een soort tumor moet worden beschouwd, en dat van alle theorieën betreffende de aetiologie van tumoren, de virustheorie, naar de mening van De Ruyck de grootste kansen zou hebben, trachtte hij deze theorie ten aanzien van de aetiologie van mola hydatidosa en chorionepithelioom te bewijzen met behulp van de, in de virologie zo bekende, eikweek.

Mola hydatidosa is vooral een verandering van de choriale delen van de villi. Indien de virustheorie juist mocht zijn, leek het aannemelijk dat het virus een bijzondere aantrekkingskracht zou hebben tot de chorioallantoïs van het bebroede kippeëi. Dit was de grondgedachte waardoor De Ruyck kwam tot het enten van suspensies van molaweefsel op de chorioallantoïs en in de amnionholte van het kippeëmbryo. Er zijn overigens wel meer virussen bekend, die tumoren veroorzaken, o.a. het sarcoom van Rous bij de kip, het fibroom van Shope bij het konijn, sommige papillomen bij mens en dier, terwijl ook de virussen van de pokkengroep en herpes simplex op het eivlies veranderingen veroorzaken, die min of meer het karakter van tumorweefsel tonen.

De Ruyck gebruikte bevruchte kippeëieren die 7–10 dagen waren bebroed en hij volgde één van de gangbare werkwijzen voor het kweken van virussen in het kippeëmbryo.

> Bij 100 cc. aqua destillata werd 3 gram stukgewreven molaweefsel gevoegd. Dit mengsel werd gedurende 15 minuten gecentrifugeerd bij een toerental van 2400 per minuut en vervolgens gefiltreerd door een Seitz (EK) filter. Bij zijn volgende proeven gebruikte hij in plaats van het Seitz filter een Chamberland L 2 filter. Contrôleproeven werden op dezelfde wijze verricht met normaal placentaweefsel en met molafiltraat, dat 10 minuten was gekookt.

De door De Ruyck verkregen resultaten worden hieronder beschreven.

Veranderingen van het ectoderm.

Het normale ectoderm bestaat uit één enkele laag van kubische, basofiele cellen. Het ectoderm van de met mola- of chorionepithelioom-filtraat geënte chorioallantoïs toonde echter op sommige plaatsen hyperplasie en metaplasie. Het was verdikt, het epitheel was plaatselijk meerlagig en lag in plooien. De epitheelcellen waren basofiel.

In het cytoplasma bevonden zich vacuolen, waardoor het verdikte en geplooide epitheel een sponsachtig uiterlijk had. Op enkele plaatsen waren de vacuolen zeer groot, de kern was pycnotisch en tegen de celwand gedrukt. In de kern en in het cytoplasma werden af en toe sterk acidofiele korrelingen gevonden in preparaten die volgens de methode van MANN gekleurd waren.

De cellulaire veranderingen waren des te sterker naargelang ze verder van de basale laag waren verwijderd, zo zelfs, dat de metaplasie zeer sterk op keratinisatie ging lijken. Er wordt op gewezen, dat deze ectodermale veranderingen niet karakteristiek zijn, maar dat sommige bekende virussen (pokken, herpes simplex) ook zulke ectodermale woekeringen met insluitsels kunnen veroorzaken.

Veranderingen van het mesoderm.

Het mesoderm was oedemateus. Naast de veranderingen welke door secundaire bacteriële infecties werden veroorzaakt, werden verplaatste ectodermale celgroepen gevonden. Deze celgroepen hadden geen verbinding met het ectoderm. Af en toe werd waargenomen, dat de basale hyperplastische cellen van het ectoderm zich afscheidden en in de diepere lagen samenklonterden tot bolletjes choriale cellen. Deze cellen toonden dezelfde afwijkingen als de cellen van het ectoderm. In deze bolletjes waren de centraal gelegen cellen zeer eosinofiel, ze waren bovendien gezwollen, toonden vacuolen en bevatten soms insluitlichaampjes. Der-

gelijke ectodermale knobbeltjes werden ook gezien in de niet-specifieke proliferaties van het ectoderm. Ze zouden van traumatische oorsprong kunnen zijn.

Aan de vaatwanden werden altijd karakteristieke afwijkingen gevonden. De endotheelcellen waren kubisch tot zelfs cylindrisch van vorm geworden. De kern lag veelal apicaal, terwijl de cel zeer gezwollen was en een helder cytoplasma bevatte.

Ook in het mesoderm werden op plaatsen, waar de allantoïs en het amnion samenkwamen, veranderingen gezien, bestaande uit vermeerdering van bindweefsel. Deze histologische beelden kunnen aan sarcoom doen denken.

De bindweefselcellen waren dikker en lagen onregelmatig gerangschikt. Uiteindelijk waren er in het mesoderm zeer grote ronde holten, welke de indruk gaven gevuld te zijn geweest met onder spanning staand vocht. Ook bij de contrôle-membranen en in de normale eivliezen werden deze holten waargenomen; in het experiment waren ze evenwel veel groter en veroorzaakten een totale vormverandering van het mesoderm.

Veranderingen van het entoderm.

Vijf dagen na de enting waren de entodermcellen van de allantoïs kubisch of cylindrisch. De kern lag, evenals in het ectoderm, apicaal. Dikwijls groeiden de cellen van het endotheel uit onder vorming van een soort varenstructuur. Het geleek daardoor zeer veel op een meerlagig cylinderepitheel. Verscheidene keren liet de top van het endotheel los. Bij het schouwen van de eieren tussen de 7de en de 10de dag werden papillomateuze proliferaties gezien, welke bij histologisch onderzoek bleken uit te gaan van de endotheelcellen. Ze vormden kleine vertakte of bolvormige tumortjes, die in de allantoïsholte uitstaken. In het centrum van deze tumortjes was dikwijls een bindweefselas te zien. De tumortjes bestonden uit basofiele kubische cellen, waarin vacuolen waren gevormd. Deze vormsels, die een sponsachtig aspect hadden, waren met het endotheel verbonden door een zeer smal stukje

epitheel, dat soms afgebroken scheen te zijn, waardoor de tumortjes los in de amnionholte schenen te liggen. Deze vormsels werden over het gehele oppervlak gevonden. De Ruyck deelt mede, nooit de beschrijving van zulke proliferaties in de literatuur te zijn tegengekomen.

B. ENTING IN DE AMNIONHOLTE

Het amnion van een embryo, dat na enting nog 11 dagen in leven was gebleven, toonde zeer veel blaasjes, die een doorsnede hadden van 2–5 mm. en gevuld waren met een visceuze ongekleurde vloeistof. Histologisch waren dezelfde afwijkingen te onderscheiden als die welke reeds beschreven zijn: heldere blaasjes, meerlagig kubisch epitheel en tumorachtige celgroeperingen. Het mesoderm toonde vele plekken met gewoekerd bindweefsel, dat min of meer sarcomateus leek. De wanden van de blaasjes waren zeer dun en hun inhoud bestond uit een licht korrelig neerslag, waarin geen cellen te herkennen waren. Het epitheel toonde dezelfde gelocaliseerde tumorformaties, bestaande uit langgerekte basofiele cellen, die in het mesoderm kleine uitspringende woekeringen vormden, ofwel in de amnionholte hingen. In de lever van het embryo werden aan de binnenkant van de bloedvaten bijzondere celgroeperingen waargenomen, die het lumen volkomen opvulden. Het merendeel van deze cellen was rond, bevatte vacuolen en scheen omgeven te zijn door een amorfe homogene massa. Er waren ook overgangen te zien tussen deze langgerekte cellen, die deden denken aan de tumorcellen van het amnion en de ronde cellen. Mitosen waren zeer frequent. Het was evenwel moeilijk de oorsprong van deze celgroeperingen vast te stellen. Het schenen haematogene uitzaaiingen te zijn van de tumortjes, welke op het amnionvlies te zien waren en die als echte embolietjes in de lever het beeld gaven van epitheliale celklompjes.

Eén gram mola hydatidosa weefsel werd in bevroren toestand gedroogd ten einde de activiteit te bewaren. Vervolgens werd het in gedestilleerd water fijngewreven en gedurende 2 uur op vriespunt gehouden, daarna door centrifugeren verdeeld volgens onderstaand schema:

1. 10 minuten bij 2000 omwentelingen per minuut.
2. De bovenstaande vloeistof werd daarna opnieuw gecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij een toerental van 20.000 in een Spinco centrifuge.
3. Het bezinksel zou, naar werd verwacht, het virus bevatten. Dit werd nu geresuspendeerd in 2 cc. gedestilleerd water en nogmaals gecentrifugeerd:
   2 minuten bij 7000 omw/min.
   2 minuten bij 8000 omw/min.
   1 minuut bij 10.000 omw/min.
4. De nu bovenstaande vloeistof werd vervolgens 30 minuten gecentrifugeerd bij 20.000 omw/min.
5. Het neerslag werd geresuspendeerd in $^1/_2$ cc. gedestilleerd water en gefiltreerd. Dit werd nu electronenmicroscopisch onderzocht.

De foto's tonen een groot aantal ronde vormsels, welke een morfologisch beeld als van virusdeeltjes hebben. Hun vorm, helderheid, regelmaat en buitengewoon groot aantal zijn inderdaad zeer suggestief voor virusdeeltjes. Hun doorsnede varieert tussen 0.05 μ en 0,1 μ. Deze vormsels zijn in preparaten van normale placentae, die op dezelfde wijze waren gemaakt, niet gevonden, maar wel bij 2 gevallen van mola hydatidosa. De vloeistof uit de blaasjes, welke experimenteel op het amnion waren verkregen, bleek ook deze vormsels te bevatten.

II. TECHNIEK VAN DE EI-ENTINGEN

Het molaweefsel, dat voor deze proeven werd gebruikt, werd ons door verschillende gynaecologen uit het land toegezonden[1]. Teneinde het eventueel in dit weefsel aanwezige virus zo weinig mogelijk te beïnvloeden, werden de molae op verzoek vers en zonder toevoeging van enig desinfectans of fixatievloeistof verzonden. Indien het weefsel niet onmiddellijk na ontvangst kon worden verwerkt, werd het in het laboratorium bij $-60°$ C bewaard, een in de virologie algemeen gebruikelijke methode ter conservering van virussen.

De verwerking van het ontvangen materiaal was in beginsel niet verschillend van de door De Ruyck gevolgde methode. De Ruyck maakte de in het ei te enten suspensies echter bacterievrij door filtratie door een bacteriefilter (Seitz), terwijl wij er antibiotica aan toevoegden. Laatstgenoemde methode is thans in de virologie de meeste gebruikelijke.

De te enten eieren waren 7–10 dagen bebroed. Voor iedere enting werden als regel 8 eieren gebruikt en wel 4 voor enting in de amnionholte en 4 voor enting op de chorioallantoïs. De eieren werden geschouwd, waarna op de schaal de plaatsen werden aangegeven waar zich de luchtkamer en het embryo bevonden. Voor enting op de chorioallantoïs werd een driehoekje uit de schaal gezaagd, waar bij het schouwen geen of weinig bloedvaten waren te zien.

De vloeistof, die als entmateriaal werd gebruikt, werd verkregen door 1 gram weefsel tot een homogene suspensie te wrijven in een mortier, onder toevoeging van een weinig glaspoeder en physiologische keukenzoutoplossing tot een totale hoeveelheid van 10 cc. Door centrifugeren gedurende 15 minuten op 3000 omwentelingen per minuut werd een sediment en een heldere bovenstaande vloeistof verkregen. Aan deze vloeistof werden

[1]) De inzenders van het materiaal betuig ik langs deze weg nogmaals gaarne mijn welgemeende dank.

per cc. 1000 E penicilline en 2,5 mgr. streptomycine toegevoegd. Ter contrôle op bacteriologische steriliteit werd een kweek op bloedagar ingezet. Hierop groeiden meestal geen bacteriën. De enting met molasuspensie, die niet geheel vrij bleek te zijn van bacteriën, leverde, zoals later zal blijken, geen overwegende bezwaren op. De microscopische afwijkingen, hierdoor ontstaan, bleken gemakkelijk als zodanig te herkennen te zijn.

Het enten geschiedde in een speciale entkast, onder ultraviolet licht en met steriele instrumenten. De enting in de amnionholte werd als volgt verricht: de luchtkamer werd gedeeltelijk geopend, met een pincet werd het schaalvlies doorbroken en een amnionplooi naar buiten getrokken. Met een Mantoux-spuitje werd 0,1 cc. vloeistof in de amnionholte gespoten. Het amnionvlies kreeg dus slechts een punctie opening. Na de enting werd het vlies losgelaten, zodat het naar zijn oorspronkelijke plaats kon terugtrekken. De opening in de schaal werd luchtdicht met cellophaan afgesloten. Voor de enting op de chorioallantoïs werd de volgende methode toegepast:

Zonder het schaalvlies te scheuren werd een driehoekig stukje schaal uitgezaagd. In het onderliggende schaalvlies werd een kleine opening gemaakt, waarop 0,1 cc. van de te enten suspensie werd gelegd. Door een gaatje te maken in de schaal ter plaatse van de luchtkamer en daardoor de lucht weg te zuigen, werd een onderdruk in het ei verkregen, als gevolg waarvan de op het vlies gedruppelde suspensie door het gaatje in het schaalvlies naar binnen werd gezogen en zich kon verspreiden op de chorioallantoïs. Het driehoekig stukje schaal werd vervolgens weer op zijn oorspronkelijke plaats gelegd en evenals het gaatje in de luchtkamer met opgesmolten paraffine afgesloten. De eieren werden nu nog 7 – 10 dagen in de broedstoof gelegd. Hierna werden ze doorgelicht en de eieren, waarvan de embryonen dood bleken te zijn, werden verwijderd. De nog levende embryo's werden gedood door de eieren te plaatsen bij een temparatuur van –20° C. Na ontdooien werden de eieren in de entkast geopend met behulp

van steriele instrumenten. De chorioallantoïs en het amnion werden ingeknipt, waarna het embryo met de dooierzak verwijderd konden worden. De eivliezen werden met een pincet verwijderd en schoongespoeld in steriele physiologische keukenzoutoplossing. Plekken waar met het blote oog of met de loupe veranderingen werden gezien, werden uitgesneden en in 3% formaline oplossing gefixeerd. De rest van de vliezen werd in een steriel buisje gedeponeerd en bij een temperatuur van –60° C. bewaard om eventueel later weer voor enting te kunnen worden gebruikt. Van de uitgesneden stukjes werden paraffine coupes gemaakt. De kleuringen welke werden toegepast waren: Haematoxyline-eosine; de kleuring volgens MANN en die volgens GIEMSA. Alle ontvangen monsters van mola hydatidosa werden voor ze werden gebruikt microscopisch gecontroleerd.

III. RESULTATEN VAN DE EI-ENTINGEN

A. EERSTE EIPASSAGE

In dit hoofdstuk worden de veranderingen beschreven van de eivliezen, die geënt zijn met suspensies van 6 molae en 1 chorion-epithelioom. Als regel werden histologische preparaten gemaakt van de chorioallantoïs, indien het materiaal op dit vlies was geënt, en van het amnion indien het materiaal in de amnionholte was geënt. De veranderingen van beide vliezen bleken in wezen met elkaar overeen te komen.

Mola no. 1.

Met de suspensie werden 4 eieren in de amnionholte en 2 op de chorioallantoïs geënt. Bij het oogsten van de vliezen bleek dat de embryo's van 2 in de amnionholte geënte eieren dood waren gegaan. Op de vliezen van beide andere eieren zijn macroscopisch een paar knobbeltjes te zien. Soortgelijke knobbeltjes zijn aanwezig op de vliezen van 2 op de chorioallantoïs geënte eieren. De knobbeltjes zijn wit van kleur, niet doorzichtig, niet ten opzichte van het vlies verschuifbaar en zij hebben ongeveer de grootte van een luciferkop. Ze zijn vast van consistentie en bevatten geen vocht.

In de, volgens de methode van Mann, gekleurde histologische preparaten van de chorioallantoïs zijn de door De Ruyck beschreven insluitlichaampjes te zien (fig. 1). Verder wordt de aandacht getrokken door een groot aantal gezwollen cellen van het ectoderm. Tussen deze blazige cellen met heterogeen protoplasma liggen kleine cellen met pycnotische kernen en bovendien kleine cellen waarin de kernen geheel vervallen zijn. Het ectoderm is ook als zodanig niet te herkennen, het vormt een vage, grillig gevormde, laag van ongelijkvormige, gezwollen en afgeronde cellen.

In de preparaten van het amnion zien we een knobbelvormige

verdikking van het mesoderm, waardoor een flinke uitbochting van het ectoderm is ontstaan. Het mesoderm bevat op deze plaats strengen, bestaande uit cellen met zeer chromatinerijke kern, die aan tumorcellen doen denken. Tussen deze celgroepen bevindt zich een vezelige, egale, kernarme massa, die aan fibrine doet denken. Het mesoderm bestaat uit een laag van zeer sterk gezwollen cellen met pycnotische, tegen de wand geplaatste kernen. Deze lijken op bekercellen. De bloedvaten zijn zeer sterk uitgezet, leeg en met een normaal uitziend endotheel bekleed. Het ectoderm toont geen afwijkingen. Er zijn geen ontstekingscellen te zien.

De haematoxyline-eosine-preparaten (fig. 2) tonen in het mesoderm groepen van blazige cellen, die lijken uit te gaan van het ectoderm. Op andere plaatsen liggen deze evenwel als geïsoleerde celgroepen in het mesoderm. Deze blazige cellen zijn onderling zeer verschillend van grootte en vorm. Soms is het cytoplasma licht troebel. Hier en daar bevinden zich celinsluitsels. De kernen zijn wat gezwollen en tonen hier en daar kerndelingsfiguren. Ook hier is het ectoderm geen scherpbegrensde laag van gelijkvormige cellen.

Mola no. 2.

Met een suspensie van deze mola werden 4 eieren in de amnionholte geënt. Eén van de eieren werd niet beoordeeld, daar het embryo dood bleek te zijn. Twee vliezen tonen macroscopisch verdikkingen, welke verder zijn onderzocht. Het ectoderm is plaatselijk meerlagig en toont papillaire woekeringen. Het mesoderm toont strengen met sterke celwoekering. Ook hele gedeelten van het mesoderm zijn zo veranderd, dat ze doen denken aan sarcomateuze haarden (fig. 3). In tegenstelling tot de cellen van het ectoderm zijn deze cellen meer spoelvormig. De kernen zijn onderling zeer wisselend van vorm, sommige hoekig, andere rond. Het cytoplasma is meestal licht troebel, maar hier en daar helder. De cellen zijn onderling ook verschillend van grootte en vorm.

Mola no. 3.

Met de suspensie van deze mola werden 4 eieren in de amnionholte en 4 op de chorioallantoïs geënt. Eén van de in de amnionholte geënte eieren is niet beoordeeld, daar het embryo dood bleek te zijn. Van de overgebleven eieren blijken 2 vliezen na amnionholte-enting tumortjes te bevatten en bij één chorioallantoïsenting wordt eveneens een aantal tumortjes op het vlies aangetroffen. Microscopisch blijken deze tumortjes uit fraaie papillomateuze woekeringen van het ectoderm te bestaan. De cellen zijn groot en blazig en zij bevatten acidofiele insluitlichaampjes. Hier en daar blijken in het mesoderm ook etterige ontstekingshaardjes door bacteriële verontreiniging te zijn ontstaan. Het ectoderm toont proliferatieve haarden, waarin verscheidene cellen vacuolen bevatten. Deze vacuolen zijn soms zo groot, dat van de kern nog slechts een klein pycnotisch lichaampje te zien is. In het mesoderm worden ectodermale celgroepen aangetroffen, welke niet zichtbaar met het ectoderm in verbinding staan. Het vaat-endotheel toont de neiging kubisch te worden, soms is er een geringe vacuolisatie. Het mesoderm is plaatselijk sterk verdikt en bevat gezwollen cellen met onregelmatig gevormde kern. Het geheel heeft een sarcomateus uiterlijk. In het cytoplasma van vele cellen bevinden zich grote eosinofiele en multiple kleine basofiele insluitlichamen.

In andere preparaten is een zeer sterke papillomateuze woekering te zien, die door een smalle brug met het eivlies is verbonden. De cellen aan de oppervlakte van de woekering bevatten grote vacuolen en kleine, wandstandige, pycnotische kernen. Binnen dit meerlagige gevacuoliseerde ectoderm bevindt zich een celrijk bindweefsel, waarin op één plaats een fraaie haard van ectodermale cellen ligt.

Daar, waar de overgang van het normale in het abnormale deel goed te zien is, wordt het uit één cellaag bestaande ectoderm plotseling meerlagig en toont aldaar opgeblazen en gevacuoliseerde cellen. In het mesoderm is een sterke vermeerdering en ver-

dikking van het bindweefsel te zien. Een tangentieel getroffen vat toont vacuolisatie van de endotheelcellen.

Sommige preparaten (fig. 4) van deze proefreeks tonen een soort poliepvorming, uitgaande van het endotheel en in de amnionholte hangende. Aan een smalle steel van blazige en gevacuoliseerde ectodermale cellen ontspruit een vormsel, dat bekleed is met blazige cellen, waarin de kern tegen de wand is gedrukt en die de indruk geven van bekercellen te zijn. Door een iets tangentiële coupe lijkt het of deze cellaag plaatselijk meerlagig is. Het mesoderm bestaat uit een sterk in het oog springende hoeveelheid bindweefsel. Dit bindweefsel bevat veel kernen, welke klein, rond en zeer rijk aan chromatine zijn. De bindweefselstrengen liggen zonder duidelijke struktuur door elkaar.

Mola no. 4.

Met de van deze mola verkregen suspensie werden 8 eieren geënt, welke 7 dagen waren bebroed. Van deze 8 eieren werden er 4 in de amnionholte en 4 op de chorioallantoïs geënt. Na nog eens 7 dagen bebroed te zijn, blijkt 1 embryo van de tweede groep dood te zijn. Bij inspectie van de vliezen worden macroscopisch zichtbare afwijkingen waargenomen bij 2 van de in de amnionholte en bij 1 van de op de chorioallantoïs geënte eieren. Alle verdachte stukjes worden gemerkt en gescheiden bewaard voor verder microscopisch onderzoek.

Over een grote lengte is het entoderm meerlagig, de cellen zijn blazig, ze zijn onderling niet van geheel de zelfde vorm en grootte. Ook worden in sommige cellen insluitlichaampjes waargenomen. Het mesoderm toont een vrij sterke bindweefselvermeerdering, welke door het onregelmatige beeld aan tumorvorming doet denken. Bovendien zijn hier en daar ectodermale celgroepen in het mesoderm te vinden, welke niet met het bovenliggende ectoderm in verbinding staan (fig. 5). Op enkele plaatsen zijn deze celgroepen sterk gevacuoliseerd.

Mola no. 5.

Voor deze proef werden 4 eieren geënt in de amnionholte en 3 op de chorioallantoïs. Na 7 dagen bebroeding blijkt 1 embryo dood te zijn.

Bij het oogsten worden er op 2 vliezen van de nog in leven zijnde embryo's geen blaasjes, maar wel vast aanvoelende bolletjes ter grootte van een luciferkop gevonden. Deze bolletjes zijn niet in het vlies verschuifbaar, ze voelen vast aan en zijn ondoorzichtig wit gekleurd. Twee andere vliezen tonen een duidelijke algehele verdikking. De overige vliezen tonen geen macroscopische afwijkingen.

Het epitheel toont op verscheidene plaatsen celvermeerdering en hier en daar is een 'epitheelwoekering' ontstaan. Het mesoderm en het vaatendotheel tonen in deze preparaten geen afwijkingen. Het entoderm toont op vele plaatsen blazige cellen, die aan bekercellen doen denken. Ze zijn onderling verschillend van grootte en van vorm. Soms is er nog een kern te onderscheiden, maar dikwijls is er geen spoor meer van te ontdekken. Deze blazige cellaag is soms vele cellen dik.

Mola no. 6.

Dit preparaat is een voorbeeld van een fraaie druifmola. De blaasjes waren zo groot als een druif van middelmatige afmetingen. Van een paar van deze blaasjes werd een suspensie gemaakt. In deze suspensie was dus naar verhouding veel meer molavocht dan weefsel aanwezig, in tegenstelling tot de suspensies van vele andere mola's, waar deze verhouding juist andersom lag. Er werden 10 eieren met deze emulsie geënt, 5 op de chorioallantoïs en 5 in de amnionholte. Na 8 dagen blijken alle embryo's nog in leven te zijn. Op 3 van de eivliezen van de in de amnionholte geënte eieren zijn scherp omschreven, vast aanvoelende, witte, niet doorschijnende bolletjes ter grootte van een speldeknop tot luciferkop aanwezig. Deze bolletjes zijn niet ten opzichte van het vlies verschuifbaar. Van de op de chorioallantoïs

geënte eieren tonen er twee geen afwijkingen. De vliezen van twee andere eieren tonen verdachte plekken, maar geen bolletjes.

Microscopisch onderzoek.

In vele preparaten is een duidelijke verdikking van het ectoderm te zien. Op sommige plaatsen is er zelfs een papillomateuze woekering te zien. De ectodermcellen zijn gezwollen en zij bevatten vacuolen, die soms zeer groot zijn. De kernen, voorzover deze nog te herkennen zijn, liggen tegen de wand van de cel. Het cytoplasma van de cellen waarin geen vacuole is te zien, is troebel, alsof het overgoten is met kleine druppeltjes. De grootte van de cellen onderling is niet gelijk. De cellen zijn niet hoekig, maar afgerond tot geheel rond. De kernen zijn meestal pycnotisch. Aan beide zijden van de papillomateuze woekering is het ectoderm normaal en éénlagig. Het bevat nog wel duidelijk zichtbare vacuolen, maar deze zijn veel kleiner dan in de cellen van de woekering. In het mesoderm bevindt zich een sterke woekering van bindweefsel. De bindweefselcellen zijn niet netjes gerangschikt, maar liggen in grillige strengen. Deze bindweefselwoekering heeft een vrij scherpe begrenzing met het mesoderm. Het mesoderm is hier normaal.

Chorionepithelioom.

Van 1 gram weefsel werd een 10 % suspensie gemaakt, zoals voor de molae is aangegeven, en geënt op de chorioallantoïs van 4 eieren. Na 10 dagen bebroeden worden in de histologische preparaten circumscripte bindweefselvelden in het mesoderm waargenomen. De vezels liggen in concentrische ringen. Enkele cellen van het ectoderm en het entoderm tonen vacuolen. De vaatjes hebben een zeer nauw lumen, dat veelal met een thrombus is gevuld. De vaatwand is hyalien en sterk verdikt.

B. EIPASSAGES

Voor het maken van eipassages werd mola no. 3 uitgekozen, omdat deze in de eerste passage bijzonder duidelijke afwijkingen van de eivliezen deed ontstaan.

Eén gram van de chorioallantoïs van de eerste eipassage werd tot een 10 % suspensie verwerkt, zoals voor het maken van de mola-suspensies is aangegeven. Hiermee werden 4 eieren op de chorioallantoïs en 4 eieren in de amnionholte geënt. Bij het oogsten op de 10e bebroedingsdag blijken 4 embryo's dood te zijn en wel 1 na enting op de chorioallantoïs en 3 na enting in de amnionholte. Bij de beoordeling van de overige eieren blijken op 1 amnion- en 2 chorioallantoïsvliezen macroscopisch zichtbare, tumorachtige woekeringen ter grootte van een luciferkop aanwezig te zijn.

Bij histologisch onderzoek vallen de eerder genoemde, los in het mesoderm liggende ectodermale celgroepen op. Verscheidene ectodermcellen zijn gevacuoliseerd en sommige bevatten ook insluitlichaampjes. Het mesoderm toont vermeerdering van bindweefsel. De afwijkingen zijn echter veel minder uitgesproken dan in de eerste passage.

Van de chorioallantoïs van de tweede eipassage werd weer een 10 % suspensie geënt in de amnionholte van 4, en op de chorioallantoïs van 4 eieren (3e passage). Bij het oogsten op de 10e dag zijn alle embryo's in leven. Op één vlies na enting op de chorioallantoïs en op 2 vliezen na enting in de amnionholte worden enkele iets verdikte plekjes gezien, waarin evenwel geen histologische afwijkingen werden gevonden.

C. BESPREKING VAN DE RESULTATEN VAN DE EI-ENTINGEN

Bij vergelijking van de resultaten van de proeven van De Ruyck en van die, welke in dit hoofdstuk zijn beschreven, blijken de afwijkingen van de eivliezen in beginsel met elkaar

overeen te komen, althans voor zover het de eerste eipassage betreft.

Er zijn duidelijke proliferatieve veranderingen van het ectoderm, die soms zelfs het karakter van papillomateuze woekeringen hebben. In deze cellen worden kernverval, vacuolisatie en acidofiele korreling waargenomen. Het mesoderm is oedemateus en het bevat dikwijls verplaatste ectodermale celgroepen. Daar echter toch op verschillende plaatsen een verbinding van deze celgroepen met het ectoderm kon worden waargenomen, zouden deze ogenschijnlijke verplaatsingen kunnen worden beschouwd als tangentieel getroffen delen van in het mesoderm groeiende ectodermproliferaties, c.q. papillomateuze woekeringen. Het is evenwel niet zeker, of alle ectodermale celgroepen op deze wijze te verklaren zijn. Door het onderzoek van serie-coupes kon namelijk niet steeds een verbinding met het ectoderm worden aangetoond. Bovendien bleken een aantal cellen in deze groepen een wandstandige pycnotische kern en vacuolen te bezitten, zonder dat het ectoderm in deze omgeving veranderingen toonde. Ook werden er soms insluitlichaampjes in gezien.

De veranderingen van de vaatwanden waren niet zo duidelijk als De Ruyck ze heeft beschreven. Wel was steeds een sterke bindweefselproliferatie in het mesoderm aanwezig, waardoor dit plaatselijk een sarcomateus aspect bezat.

De veranderingen van het entoderm waren eveneens goed te zien, met name de varenstructuur, die van het entoderm uitgaat en in de amnion- of allantoïsholte hangt. Voorts bestonden de veranderingen van het entoderm in plaatselijk meerlagig hoog cilinderepitheel.

In tegenstelling tot De Ruyck gelukte het ons niet, de overentbaarheid van het agens, dat de veranderingen in de eerste eipassage veroorzaakt, aan te tonen. Weliswaar waren in de tweede eipassage nog afwijkingen aanwezig, doch veel minder duidelijk dan in de eerste. In de derde passage waren in 't geheel geen histologische afwijkingen aantoonbaar. Wanneer men meent,

dat de verwekker een voor de vliezen van het kippeëmbryo pathogeen virus is, dan is toch wel een eerste vereiste voor de bewijsvoering, dat de afwijkingen in een reeks passages moeten ontstaan. Daar zulks in onze proeven niet het geval bleek te zijn, is er vooralsnog geen reden, de opvatting te steunen, dat mola hydatidosa en chorionepithelioom door een, voor het kippeembryo pathogeen, virus worden veroorzaakt.

De vraag komt dan naar voren, waaraan die veranderingen dan wel zijn toe te schrijven. In de volgende hoofdstukken zal getracht worden hierop een antwoord te vinden.

IV. CONTROLEPROEVEN

Reeds van de aanvang van het onderzoek af werd naast enige series ei-entingen met mola- of chorionepithelioom suspensie een controle-serie ingezet, waarbij het uitgangsmateriaal op dezelfde wijze werd behandeld en op dezelfde wijze in eieren werd geënt. Als uitgangsmateriaal werd normaal placenta weefsel en verhitte suspensie van mola en chorionepithelioom gebruikt.

A. NORMAAL PLACENTA WEEFSEL

De proefopstelling was geheel dezelfde als die, welke bij het enten met molaweefsel werd gevolgd.

Proef no. 1.

Er werden 4 eieren geënt op de chorioallantoïs en 4 in de amnionholte. Al deze eieren waren 8 dagen bebroed geweest en werden na de enting nogmaals 8 dagen bebroed. Met de normale voorzorgen van steriliteit werden ze geoogst en macroscopisch bekeken. Hoewel er geen afwijkingen aan gezien werden, werden toch van 3 vliezen microscopische preparaten gemaakt. Deze tonen geen afwijkingen. Ze zien er uit als of er geen enting heeft plaats gehad (fig. 6).

Proef no. 2.

Van de 9 eieren werden er 4 op de chorioallantoïs en 5 in de amnionholte geënt, met een suspensie van een andere normale placenta. Na nogmaals 8 dagen bebroeden blijken alle eieren nog in leven te zijn. Zowel macroscopisch als microscopisch worden geen afwijkingen gezien.

Proef no. 3.

Met een derde normale placenta werd dezelfde gang van zaken gevolgd als bij proef No. 2. Bij het oogsten van deze eieren

worden macroscopisch afwijkingen gevonden. De vliezen zien er plaatselijk wat doffer uit dan normaal. Bij microscopisch onderzoek blijkt dit niet te berusten op ectodermale woekeringen, maar op secundaire bacteriële ontsteking. Wel worden hier en daar plekken gezien waar de ectodermcellen in iets blazige cellen zijn veranderd. Het ectoderm is evenwel nergens dikker dan één cellaag. Deze veranderingen worden niet gezien op de plaatsen waar de ontstekingsinfiltraten zijn gelegen.

Proef no. 4.

Nogmaals werd dezelfde proefopstelling gevolgd. Er werden 8 eieren geënt, voor iedere methode van enting 4. Eén embryo blijkt na de broedtijd van 7 dagen dood te zijn. Microscopisch worden geen afwijkingen waargenomen.

Proef no. 5.

Ook bij de 5de proef met normaal placentaweefsel, waarbij 9 eieren werden geënt, ontstonden geen microscopische afwijkingen.

B. VERHITTE SUSPENSIE

Proef no. 1.

Een vers gemaakte suspensie van mola no. 3, die na enting duidelijke veranderingen op de eivliezen veroorzaakte (zie blz. 18) werd gedurende 1 uur op 56° C verhit. Met de verhitte suspensie werden 4 eieren op de chorioallantoïs geënt. Bij het oogsten worden verdikte vliezen gevonden, die bij histologisch onderzoek wel een bindweefselproliferatie in het mesoderm, maar geen afwijkingen van het ectoderm tonen.

Proef no. 2.

Twee 10% suspensies van chorionepithelioom werden gedurende een uur verhit op 56° C. respectievelijk 100° C. Met beide suspensies werden 4 eieren op de chorioallantoïs geënt. Na 10 dagen

bebroeden bleken alle embryo's die met de op 56° C. verhitte suspensie waren geënt, dood te zijn. Bij herhaling van de proef bleven ze echter alle in leven.

Bij histologisch onderzoek van de vliezen, die geënt waren met de op 56° C. verhitte suspensie, worden in het mesoderm groepen van bindweefselvezels gevonden, die scherp van de omgeving zijn gescheiden. De vezels liggen in concentrische ringen. Er zijn weinig kernen te zien. De kernen tonen geen afwijkingen. Zowel het mesoderm als het ectoderm bevat enige gevacuoliseerde cellen.

De preparaten van de vliezen die geënt zijn met de op 100° C. verhitte suspensie tonen in 't geheel geen afwijkingen. Het beeld is overal zo normaal alsof er geen enting was verricht.

Het in mola hydatidosa en chorionepithelioom aanwezige agens, dat verantwoordelijk moet worden gesteld voor de eivliesveranderingen, wordt blijkbaar door verhitting op 56° C. niet geheel, door verhitting op 100° C. wel geheel geïnactiveerd. Het feit, dat het een zekere weerstand schijnt te bezitten tegen een temperatuur van 56° C. behoeft niet tegen een virus te pleiten. De virus-aetiologie is evenwel reeds om een andere reden, met name de niet-overentbaarheid, als onwaarschijnlijk geacht.

Daar vooral in de eerste 3 maanden van de zwangerschap gonadotroop hormoon in grote hoeveelheid in het bloed van de moeder aanwezig is, zou gedacht kunnen worden aan de mogelijkheid, dat dit een rol zou kunnen spelen bij het ontstaan van de eivliesveranderingen. Hoewel deze gedachte vreemd aandoet, nadat gebleken is, dat een suspensie van normale placenta geen afwijkingen op de eivliezen doet ontstaan, hebben de hieronder beschreven proeven met pregnyl en gestyl toch tot merkwaardige, niet goed te interpreteren, resultaten geleid.

PREGNYL

Proef no. 1.

Negen eieren werden met 0,1 cc. pregnyl-oplossing, bevattende 50 E, geënt. Als oplosmiddel werd het bijgevoegde solvens gebruikt. Na 10 dagen blijken er nog slechts 2 eieren in leven te zijn. De vliezen van deze eieren, waarvan er één in de amnionholte en één op de chorioallantoïs was geënt, tonen macroscopisch verdachte verdikkingen. Deze werden microscopisch onderzocht. In deze preparaten wordt aan het epitheel geen afwijking gevonden. Het mesoderm is wel breder dan normaal. Het valt op, dat de arteriolen een zeer nauw lumen hebben. Hier en daar is het gehele lumen met een thrombus gevuld. Er is geen vermeerdering van bindweefsel te vinden. Ook het ectoderm is niet blazig veranderd.

Proef no. 2.

Daar er zoveel embryo's in de eerste proef waren doodgegaan, werd deze herhaald met 0,1 cc. pregnyl, bevattende 25 E. Na 10 dagen te zijn bebroed werden de vliezen onderzocht. Van de 9 eieren zijn er nog 6 in leven. Macroscopisch en microscopisch worden geen afwijkingen gezien.

Proef no. 3.

De vorige proef met 0,1 cc. (25 E. pregnyl) werd herhaald. Van de 5 geënte eieren blijken er na 10 dagen nog 3 in leven te zijn. Macroscopisch tonen ook deze geen afwijkingen. Microscopisch wordt hier en daar een, zij het schijnbare, proliferatie van het ectoderm waargenomen, maar dit is toe te schrijven aan de plaatselijk tangentieel getroffen coupe. Alle cellen van het ectoderm zijn volkomen gelijk en normaal, ook in het tantentieel getroffen deel. Het mesoderm laat nergens een vermeerdering van bindweefsel zien. Ook de vaten, hoewel sterk gevuld, tonen geen afwijkingen. Het endotheel is overal één cellaag dik, zonder dat er bijzonderheden aan te zien zijn.

GESTYL

Proef no. 1.

Acht eieren werden geënt met 0,1 cc. solvens, waarin 25 E. gestyl waren opgelost. Bij het oogsten op de 10de dag blijken alle embryo's nog in leven te zijn. Van de 4 eieren, die op de chorioallantoïs waren geënt, zijn de vliezen zeer dik en tonen hier en daar ook melkwitte, vastaanvoelende, niet in de vliezen verschuifbare, knobbeltjes. Aan de vliezen van de 4 eieren na enting in de amnionholte zijn geen afwijkingen te zien, op enkele zeer plaatselijke verdikkingen na.

Bij microscopisch onderzoek werd een sterke vermeerdering van bindweefsel in het mesoderm gevonden (fig. 7). Het ectoderm toont geen bijzonderheden. Het entoderm toont op enkele plaatsen een geringe neiging tot papilvorming. Overigens worden geen afwijkingen gezien.

Proef no. 2.

Dit is een herhaling van de vorige proef.

Op dezelfde wijze werden 3 eieren op de chorioallantoïs en 2 eieren in de amnionholte geënt. Na 10 dagen bebroeden blijken

alle eieren nog in leven te zijn. Bij het oogsten worden ook hier weer aan alle vliezen macroscopisch zichtbare verdikkingen gezien.

Zowel op de vliezen na de enting op de chorioallantoïs, als na enting in de amnionholte zijn de afwijkingen gelijk. Het epitheel toont plaatselijk een soort schilachtige verdikking, waarvan de cellen niet meer in vorm en grootte aan elkaar gelijk zijn. Het protoplasma toont doorgaans geen troebelingen, de kernen zijn even groot en liggen centraal. Weer wordt een duidelijke vermeerdering van bindweefsel aangetroffen, maar de struktuur is geheel regelmatig. Ook worden er plaatsen gezien waar de ectodermcellen blazig zijn veranderd. De celkernen zijn voor het grootste deel verdwenen. Het protoplasma is hier wel troebel en toont ook vaak vacuolisatie (fig. 8, 9, 10).

Proef no. 3.

Ook voor deze proef werden de eieren geënt met 0,1 cc. solvens, waarin 25 E. gestyl was opgelost, twee eieren op de chorioallantoïs en twee in de amnionholte. Bij het schouwen op de 10de dag blijkt één embryo dood te zijn. Alle vliezen zijn sterk verdikt.

Microscopisch valt weer de sterke vermeerdering van bindweefsel in het mesoderm op. Het mesoderm toont verder ook een sterke celvermeerdering; deze cellen bevatten dikwijls vacuolen en een kleine chromatinerijke, wandstandige kern. De kernen zijn onderling verschillend van vorm en grootte. De cellen tonen een grote overeenkomst met ectodermcellen. De cellen die geen vacuolen bevatten en bovendien niet behoren tot de bindweefselcellen, bezitten een troebel protoplasma. Het ectoderm toont geen afwijkingen evenals het vaatendotheel. Het entoderm bevat plaatselijk blazige cellen met vacuolen. Met een suspensie van deze vliezen werd een tweede en daarna een derde eipassage gemaakt. Daar bij alle vorige entingen gebleken was, dat de enting in de amnionholte wat resultaten betrof iets achter stond bij de enting op de chorioallantoïs, werd alleen bij 5–7 eieren op de

chorioallantoïs geënt. Na 10 dagen bebroeden blijken alle embryo's nog te leven. In alle passages zijn de vliezen macroscopisch niet verdikt, microscopisch hebben ze de normale dikte. Het ectoderm is overal normaal één cellaag dik, de cellen tonen geen afwijkingen. In het mesoderm is geen vermeerdering van bindweefsel te zien. Opvallend is in dit geval overigens, dat de cellen alle even groot zijn en fraai gerangschikt liggen. Het protoplasma is niet troebel en bevat nergens een vacuole. De kernen zijn onderling even groot en bevatten ook evenveel chromatine. Ze liggen in het midden van de cel.

Daar het mogelijk zou kunnen zijn dat niet het hormoon, maar het oplosmiddel de verwekker van de afwijkingen van de eerste eipassage is, zijn ook entingen verricht met het oplosmiddel.

Proef no. 4.

Drie eieren werden op de chorioallantoïs geënt met 0,1 cc. solvens. Bij het oogsten na 10 dagen worden alle embryo's in leven bevonden. Macroscopisch worden er geen afwijkingen gevonden. De vliezen zijn normaal van dikte en bevatten geen vastaanvoelende knobbeltjes.

Proef no. 5.

De vorige proef werd herhaald. Nu 5 eieren met dezelfde hoeveelheid solvens geënt. Er worden macroscopisch weer geen afwijkingen gevonden. Microscopisch worden bij deze twee proeven geen afwijkingen aangetroffen. Over het gehele preparaat is het beeld gelijk. Wel vinden we ook hier epitheelverdikkingen, maar deze blijken, gezien de opvolgende, in serie gesneden, coupes, slechts tangentieel aangesneden stukjes te zijn.

Proef no. 6.

Daar de bij enting met gestyl gevonden afwijkingen zeer waarschijnlijk afhankelijk zijn van de concentratie van het hormoon, werden eieren geënt met 0,1 cc. solvens, waarin slechts 5 E. gestyl

waren opgelost. Na 10 dagen zijn alle 8 eieren nog in leven. Zowel macroscopisch als microscopisch worden geen bijzonderheden gevonden. Deze gestylconcentratie was blijkbaar te klein om afwijkingen aan de eivliezen te veroorzaken. Enting met 50 E. gestyl in 0,1 cc. solvens leverde echter dikke, oedemateuze eivliezen op. Een hiervan gemaakte suspensie werd doorgeënt op 5 eieren. Bij de oogst na 10 dagen blijken ook deze vliezen dik te zijn. Hiervan werd weer een suspensie gemaakt, waarmee eveneens 5 eieren werden geënt. Bij deze oogst werden nog een paar dikke vliezen gevonden, maar veel minder opvallend.

Bij histologisch onderzoek blijken ook hier de al meermalen gevonden afwijkingen van het ectoderm aanwezig te zijn, maar zij verminderen kwalitatief en kwantitatief snel in de volgende eipassages. De bindweefselproliferatie daarentegen, blijft in tenminste 3 eipassages aanwezig.

Wanneer wij de resultaten van de proeven met gonadotrope hormonen aan een nadere beschouwing onderwerpen, dan moet opgemerkt worden dat gestyl, mits de concentratie hoog genoeg is, dezelfde eivliesveranderingen veroorzaakt als de mola- en chorionepithelioomsuspensies. Waarom pregnyl deze afwijkingen niet veroorzaakt, is niet duidelijk. Weliswaar is pregnyl een product van de mens en gestyl een product van het paard, maar voor de vliezen van het kippeëmbryo zijn ze beide soortvreemde stoffen, dus in dit opzicht was niet te verwachten dat zij ten aanzien van de reactie op de eivliezen verschillen zouden tonen. Nu echter pregnyl en suspensie van de normale placenta geen reactie op de eivliezen veroorzaken, zulks in tegenstelling met suspensies van mola hydatidosa en chorionepithelioom, kan moeilijk de conclusie worden getrokken, dat de door laatstgenoemde suspensies veroorzaakte reacties van de eivliezen door gonodotroop hormoon van de mens zijn ontstaan. Het is derhalve ook moeilijk te aanvaarden, dat mola hydatidosa en chorionepithelioom door gonadotroop hormoon worden veroorzaakt.

VI. BESPREKING

Na enting van suspensies van mola hydatidosa en van chorionepithelioom kunnen aan de vliezen van het kippeëmbryo bepaalde, op tumorvorming gelijkende, afwijkingen ontstaan: verdikking van het ectoderm, soms tot papillomateuze woekeringen toe, en vermeerdering van bindweefsel in het mesoderm, dat daardoor een sarcomateus uiterlijk kan krijgen. Overentbaarheid van deze afwijkingen in die zin, dat in de volgende eipassages kwalitatief en kwantitatief dezelfde afwijkingen ontstonden, kon niet worden aangetoond.

Nu deed zich de vraag voor, of deze afwijkingen als specifiek mogen worden beschouwd. Er zijn voorbeelden bekend, waar een foutieve interpretatie van veranderingen aan de eivliezen ten onrechte heeft geleid tot publicatie van de ontdekking van een nieuw virus, ondanks herhaalde waarschuwingen in de literatuur, voorzichtig te zijn met de interpretatie van zulke veranderingen (BEVERIDGE en BURNET)[1]. Zo is dan ook herhaaldelijk gebleken, dat eivliesveranderingen, die waren beschreven als gevolg van de specifieke activiteit van een virus, niets anders dan niet-specifieke afwijkingen waren, die gemakkelijk op de tere eivliezen ontstonden na enting met allerlei stoffen.

Na afsluiting van de in deze verhandeling beschreven proeven, verrichtten WYLER en VAN TONGEREN[2] (Afdeling voor Bacteriologie en Experimentele Pathologie van het Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde) een reeks onderzoekingen over niet-specifieke veranderingen op de chorioallantoïs van het kippeëmbryo als gevolg van de enting van allerlei indifferent materiaal. Het manuscript van hun nog niet gepubliceerd werk, dat zij welwillend ter inzage afstonden, vermeldt het opwekken van ectodermale proliferaties, al of niet met degeneratieve ver-

[1]) W. I. B. BEVERIDGE and F. M. BURNET: Medical Research Council Spec. Rep. Series Nr. 256 (1946).
[2]) R. WYLER and H. A. E. VAN TONGEREN. Journ. Path. and Bact. (1957).

anderingen, vacuolisatie, papillomateuze woekeringen, op celinsluitsels gelijkende vormsels, proliferatie van fibroblasten en ingroei van ectodermale cellen in het mesoderm na enting van waterige oplossingen en suspensies van normale weefsels met en zonder toevoeging van antibiotica.

Alhoewel in onze controleproeven normaal placenta-weefsel en verhitte mola-suspensie deze eivliesveranderingen niet deden ontstaan, zijn de waarnemingen van WYLER en VAN TONGEREN en onze mislukte overentingen geen steun voor de opvatting van DE RUYCK, als zouden mola en chorionepithelioom door een virus worden veroorzaakt.

Ook voor de betekenis van gonadotrope hormonen voor dit vraagstuk zijn geen argumenten aan te voeren. Wel deden de entingen met gestyl zulke duidelijke, met de concentratie van deze hormonen evenredige, eivliesafwijkingen ontstaan, maar gestyl, als produkt van het paard, kan op het ontstaan van mola hydatidosa en chorionepithelioom van de mens uiteraard geen invloed hebben. Pregnyl zou dit in beginsel wel kunnen, doch de eivliezen reageerden juist niet op de enting met dit produkt, evenmin als op de enting met normale placenta.

SAMENVATTING

Geïnspireerd door de proeven van De Ruyck, welke erop schenen te wijzen, dat de oorzaak van de mola hydatidosa een virus zou zijn, werden van een aantal mola monsters suspensies gemaakt, die in bevruchte kippeëieren werden geënt. De enting geschiedde zowel in de amnionholte als op de chorioallantoïs van tien dagen bebroede eieren. Na nogmaals tien dagen bebroeden werden de vliezen uitgeprepareerd en zowel macroscopisch als microscopisch op afwijkingen onderzocht. We vonden in grote lijnen dezelfde afwijkingen als door De Ruyck waren beschreven. Deze bestonden uit verdikking van het ectoderm, vermeerdering van het bindweefsel in het mesoderm, dat op sommige plaatsen sarcomateus leek. Ook werd op enkele plaatsen vermeerdering van het vaatendotheel vastgesteld. Het ectoderm was op vele plaatsen verdikt terwijl de entodermcellen ook veranderingen toonden. De beelden, verkregen na enting in de amnionholte en die welke werden gevonden na enting op de chorioallantoïs, waren volkomen gelijk. De afwijkingen, welke door De Ruyck werden aangetroffen in de levers van de embryonen, werden niet gevonden. Aan de levers werden in het geheel geen afwijkingen geconstateerd. Behalve de rechtstreekse entingen werden ook weer entingen verricht met suspensies verkregen uit de vliezen waar veranderingen in waren gevonden. Bij het oogsten van deze passage en ook bij de volgende, in het totaal vier, werden dezelfde afwijkingen gevonden, maar minder duidelijk dan in de eerste passage. Elke suspensie, zowel van mola als van de vliezen, werd gecontroleerd op bacteriologische steriliteit. Controleproeven werden op dezelfde wijze ingezet met normaal placentaweefsel. Hier werden geen afwijkingen aan de eivliezen gevonden. De geleidelijk minder wordende afwijkingen in de opeenvolgende passages wekten de indruk, dat zij niet zozeer door de overentbare smetstof, alswel door een in mola hydatidosa aanwezige stof, die in de volgende passages sterk in concentratie afneemt,

worden veroorzaakt. Hierbij werd gedacht aan vrouwelijk gonadotroop hormoon. Teneinde deze gedachtengang te toetsen, werden eieren geënt met pregnyl en gestyl, waarvan de eerste in de graviditeit in sterk verhoogde concentratie in de bloedbaan aanwezig is. Bij de gestylproeven bleken de beschreven afwijkingen in sterkere mate aanwezig te zijn, dan na enting van mola suspensie. We moeten dus hier de conclusie uit trekken, dat niet een virus de oorzaak is van het ontstaan van de mola hydatidosa.

Wel is merkwaardig, dat de afwijkingen die ontstonden na enting met mola suspensie dezelfde afwijkingen gaven, hoewel in iets mindere mate, als die welke ontstonden na enting met gestyl. De duidelijkheid van de afwijking hield verband met de concentratie. Om zeker te zijn, dat de afwijkingen niet door andere oorzaken zijn ontstaan werden nog entingen verricht met het hormoonoplosmiddel, met normaal water en met verhit mola-weefsel. Geen van deze proeven toonden de afwijkingen, welke werden beschreven. Er moet dan ook worden aangenomen, dat de veranderingen aan de eivliezen door gestyl worden teweeggebracht, hoewel de hormonen als aethyologisch moment onduidelijk blijven, daar gestyl niet bij de mens maar bij het paard voorkomt.

SUMMARY

Drawing inspiration from experiments by De Ruyck, which seemed to point to a virus as the causative agent of hydatid mole, the author prepared suspensions of a number of mole specimens and introduced these into fertilized hens' eggs. Inoculation was done both into the amniotic cavity and onto the chorio-allantoic membrane of 10-day-old developing eggs. After an additional incubation period of 10 days the membranes were prepared and examined, macroscopically as well as under the microscope, on the presence of pathological changes. Broadly the same changes as also reported by De Ruyck were found. These consisted of ectodermal thickening and abnormal proliferation of mesodermal connective tissue, which in places appeared to be sarcomatous. In a number of places, too, undue growth of vascular endothelium could be established. The ectoderm appeared to be thickened at many places, whilst changes could also be noted in the endodermal cells. The picture presenting following inoculation into the amniotic cavity and that following implantation onto the chorio-allantoic membrane was perfectly identical. No pathological changes, as observed by De Ruyck, in the embryonic livers were observed by us. Apart from direct implantations, serial passages were also made with the aid of suspensions obtained from membranes in which the changes had occurred. Examination of test specimens of the first, but also of the next passages, amounting to four in total, revealed the same anomalies, although the latter were less distinct than those of the first passage. All specimen suspensions used, both molar and those prepared from the membranes, were checked for bacteriological sterility. Control tests using normal placental tissue were set up in an identical manner. With the aid of these tests no changes of the egg membranes could be established. The gradually decreasing pathological changes concerned gave the impression of being caused, not so much by the transmissible virus, but rather by

some agent present in hydatid mole tissue and strongly diminishing in concentration in the course of the serial transfer. The presence of a female gonadotropic hormone suggested itself. With a view of verifying these eggs were inoculated with pregnyl and gestyl, the first of which is present in highly increased concentration in the blood during pregnancy. The gestyl test showed the changes described to be present in a higher degree than was the case following inoculation with molar suspension. The conclusion seems therefore warranted that no virus is responsible for the occurrence of hydatid mole.

However, it certainly is remarkable that the anomalies occurring after inoculation with molar suspension gave rise to identical, if less marked, changes than those occurring after inoculation with gestyl. The degree in which the changes were present bore a relation to the concentration. To make sure that the changes could not have been occurred through other causes, inoculations were also performed with hormone solvent, normal water and with heated molar tissue, respectively. None of these tests revealed any of the changes as described above. The conclusion seems therefore inevitable that the changes in the egg membranes were caused by gestyl. Yet, the aetiological significance of hormenes remains still obscure, because gestyl is not a human but a horse product.

RÉSUMÉ

Sous l'inspiration des expériences de De Ruyck, qui portaient à croire que la cause de la môle hydatiforme était un virus, on fit d'un certain nombre d'échantillons de môle des suspensions, qui furent ensemencées dans des œufs de poule fécondés. L'ensemencement se fit tant dans la cavité amniotique que sur la chorio-allantoïde d'œufs ayant subi 10 jours d'incubation. Après une nouvelle décade d'incubation, on fit une préparation des membranes, où on rechercha macroscopiquement aussi bien que microscopiquement les altérations. Les altérations constatées correspondaient généralemente à celles qu'avait décrit De Ruyck. Elles consistaient dans un épaississement de l'ectoderme, une augmentation du tissu conjonctif dans le mésoderme, qui semblait sarcomateux par endroits. Nous avons également observé en quelques endroits une augmentation de l'endothelium vasculaire. En beaucoup d'endroits, l'ectoderme présentait un épaississement tandis que les cellules de l'endoderme étaient également modifiées. Le tableau obtenu par ensemencement dans la cavité amniotique était parfaitement égal à celui que produisait l'ensemencement sur la membrane chorioallantoïdienne. Nous n'avons pas constaté les modifications observées par De Ruyck dans le foie des fœtus. Nous n'avons constaté aucune modification du foie. En plus des ensemencements directs, nous avons encore ensemencé des suspensions fournies par les membranes ayant présenté des modifications. Ce premier passage et les suivants, au nombre de quatre au total, produisirent les mêmes altérations, mais moins claires que lors de la première inoculation. Chaque suspension, de la môle aussi bien que des membranes, fut contrôlée pour en établir la stérilité bactérienne. On entreprit de mêmes essais, de contrôle cette fois, avec du tissu placentaire normal. Ici, nous ne trouvâmes pas de modifications des membranes ovulaires. La diminution graduelle des modifications dans les passages successifs produisaient l'impression que la cause n'était pas un

contage inoculable, mais plutôt par une substance présente dans la môle hydatiforme et dont la concentration diminuerait fortement au cours des passages suivants. Nous avons pensé à ce sujet à une hormone gonadotrope féminine. Afin de vérifier ce raisonnement, nous avons inoculé des œufs de pregnyl et de gestyl, hormones présentes à une concentration augmentée dans le sang durant la grossesse. Le gestyl produisit ces modifications à un plus haut degré qu'après inoculation d'une suspension de môle. Il faut donc en conclure que la formation de la môle hydatiforme n'est pas due à un virus.

Il est pourtant remarquable que les altérations produites par l'inoculation de la suspension de môle étaient les mêmes, mais un peu moins prononcées, que celles que provoquait l'inoculation de gestyl. Le degré d'altération dépendait de la concentration. Pour être assuré que les modifications ne sont pas attribuables à d'autres causes, nous avons encore fait des inoculations du solvant des hormones, d'eau et de tissu de môle chauffé. Dans aucun de ces essais n'apparurent les modifications que nous avons décrites. Aussi faut-il admettre que les modifications des membranes ovulaires sont déterminées par le gestyl. Cependant, le rôle étiologique des hormones semble assez obscure, parce que le gestyl n'est pas un produit humain, mais un produit du cheval.

AFBEELDINGEN

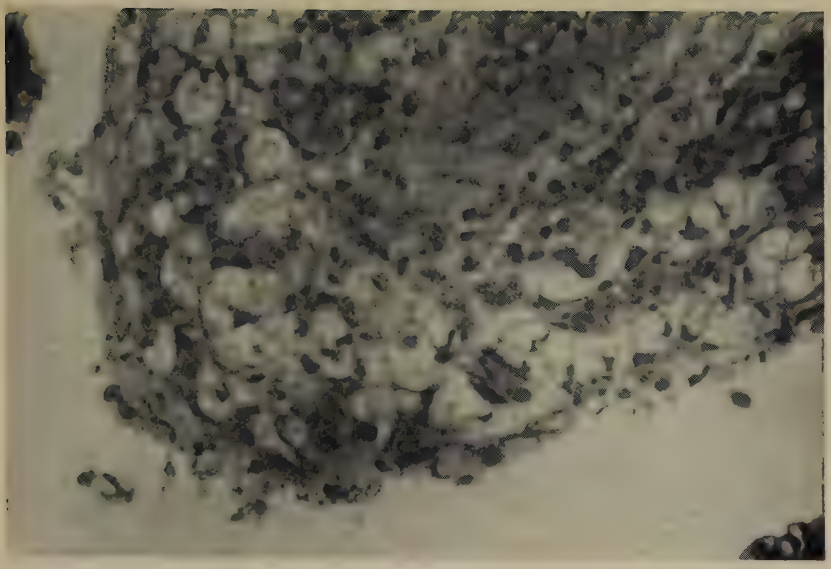


FIG. 1. EERSTE AMNION-PASSAGE, MOLA NO. 1.
Kleuring volgens Mann. Het epitheel is veranderd in grote blazige, met troebele vloeistof gevulde cellen. Sommige kernen tonen insluitlichaampjes.

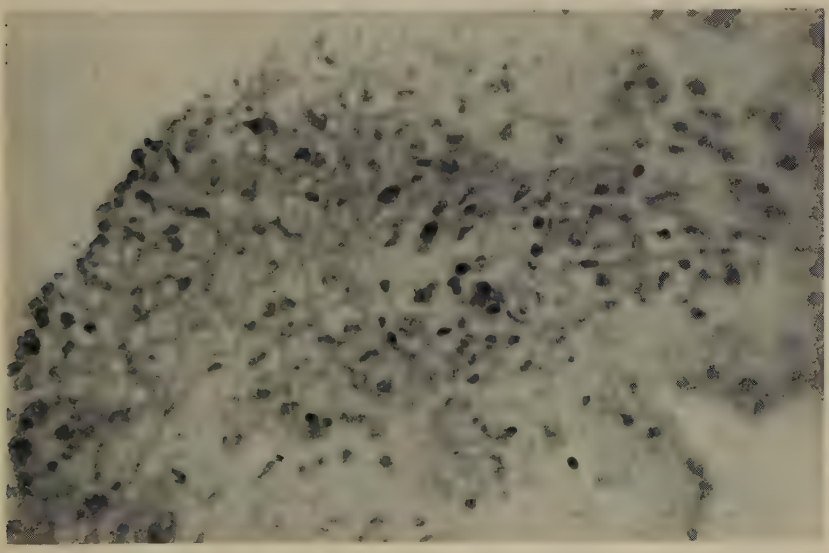


FIG. 2. EERSTE AMNION-PASSAGE, MOLA NO. 1.
Kleuring met haematoxiline-eosine. De cellen van het mesoderm verschillen onderling zeer sterk in vorm en grootte. Het protoplasma is dikwijls troebel en bevat soms celinsluitsels. Soms is de cel in een kleine vacuole veranderd. De kernen zijn onderling ook zeer verschillend in vorm, grootte en rijkdom aan chromatine. Vele kernen tonen kernverval.

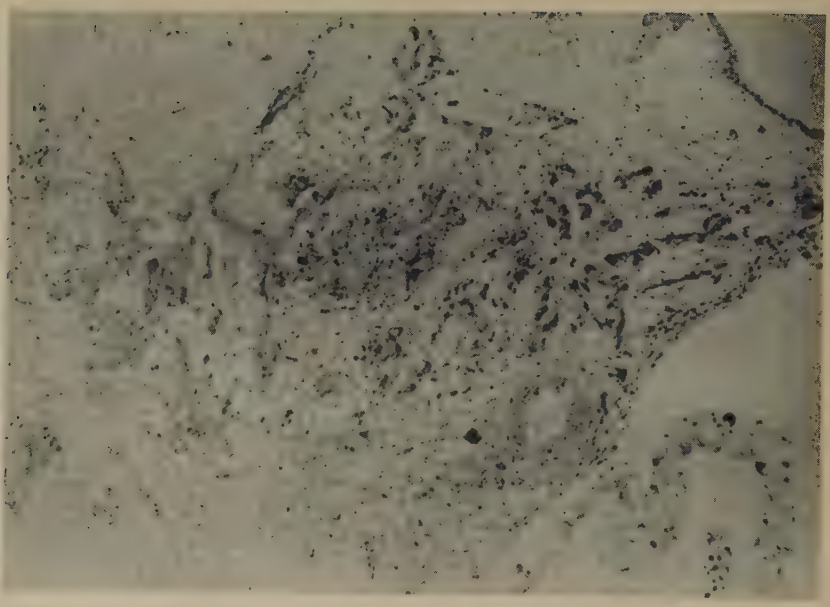


FIG. 3. EERSTE AMNION-PASSAGE, MOLA NO. 2.
Kleuring met haematoxiline-eosine. Bindweefselvermeerdering, welke zeer grillig door het mesoderm ligt. Het endotheel van het getroffen vaatje toont geen afwijkingen.

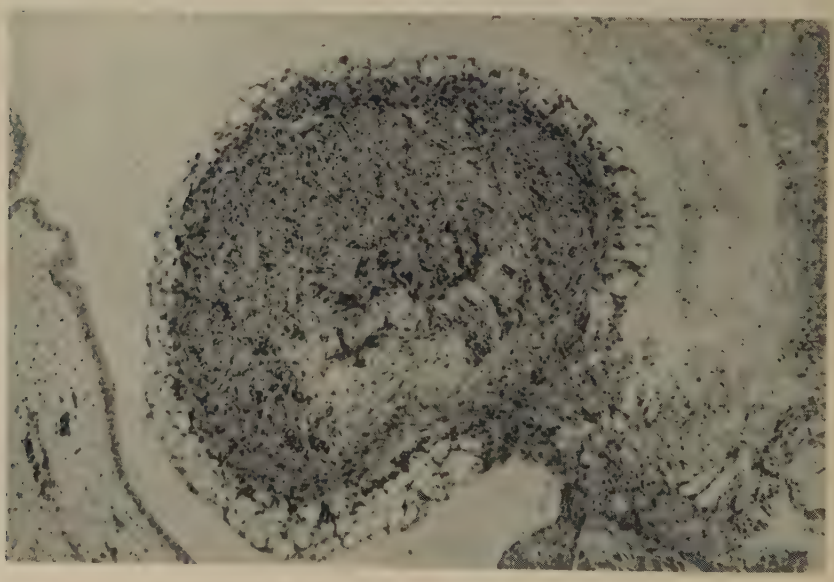


FIG. 4. EERSTE AMNION-PASSAGE, MOLA NO. 3.
Papillomateuze woekering. Het bindweefsel is zeer grillig en sterk vermeerderd. Het is ook zeer kernrijk. De smalle steel met het verdere weefsel toont op enkele plaatsen kleine vacuolen. De kern van deze cellen is meestal niet meer te herkennen en ligt, zo hij nog te herkennen is, als een kleine pycnotische rest tegen de wand van de cel. Het epitheel van de tumor bestaat uit vele blazige cellen, waarin de kleine pycnotische kernen tegen de wand liggen, maar meestal niet meer te herkennen zijn.

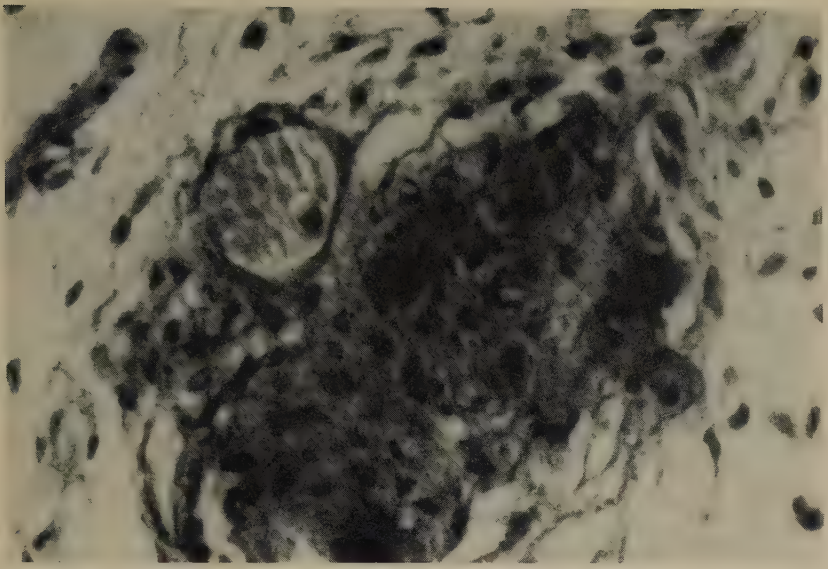


FIG. 5. EERSTE CHORIOALLANTOÏS-PASSAGE, MOLA NO. 4.
Ectodermale celgroep in het mesoderm.

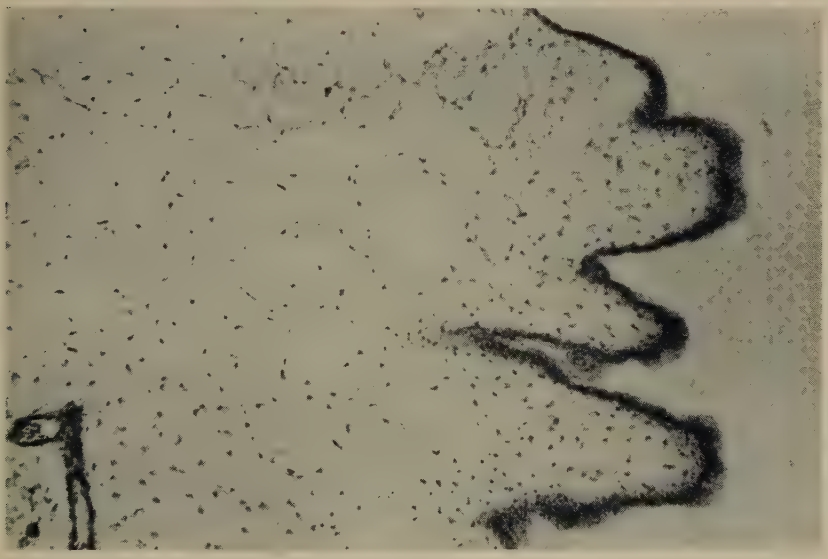


FIG. 6. CHORIOALLANTOÏSPASSAGE VAN NORMAAL PLACENTA WEEFSEL.
Hier is duidelijk het losmazig mesoderm te zien zonder enige bindweefselvorming. De kernen zijn onderling volkomen gelijk. Het is een volkomen egaal beeld. Ook het epitheel, dat hier en daar iets tangentieel is getroffen, toont gelijke cellen en kernen. Het vaat-endotheel is een cellaag dik.

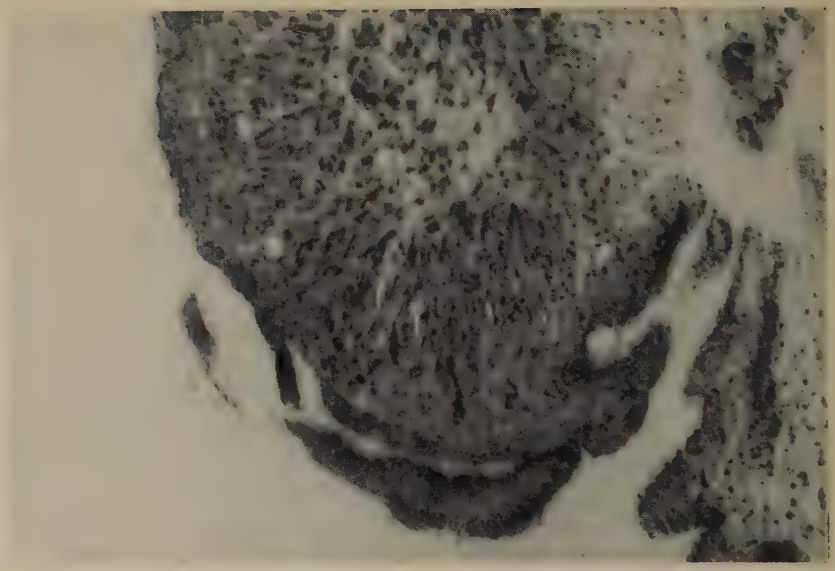


FIG. 7. EERSTE AMNION-PASSAGE GESTYL.
Het mesoderm toont een zeer sterke vermeerdering van bindweefsel. Dit ligt evenwel niet normaal in lagen gerangschikt, maar de vezels liggen in strengen die loodrecht op het epitheel staan.

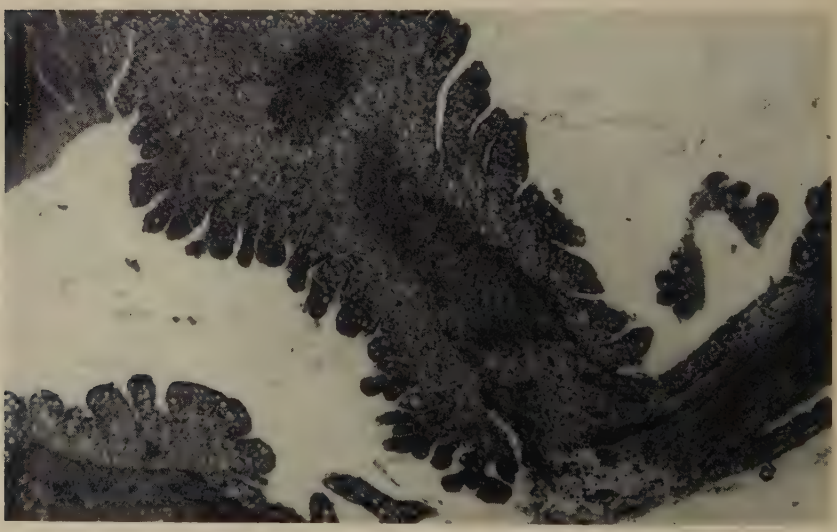


FIG. 8. EERSTE CHORIOALLANTOÏS-PASSAGE GESTYL.
Blazige woekering van het epitheel. De cellen bevatten vacuolen, welke onderling niet even groot zijn. Van een kern is soms nog slechts een hoekig, chromatinerijk klein schilfertje over. Dikwijls is er evenwel in het geheel geen kernrest meer te vinden. Het protoplasma is troebel.

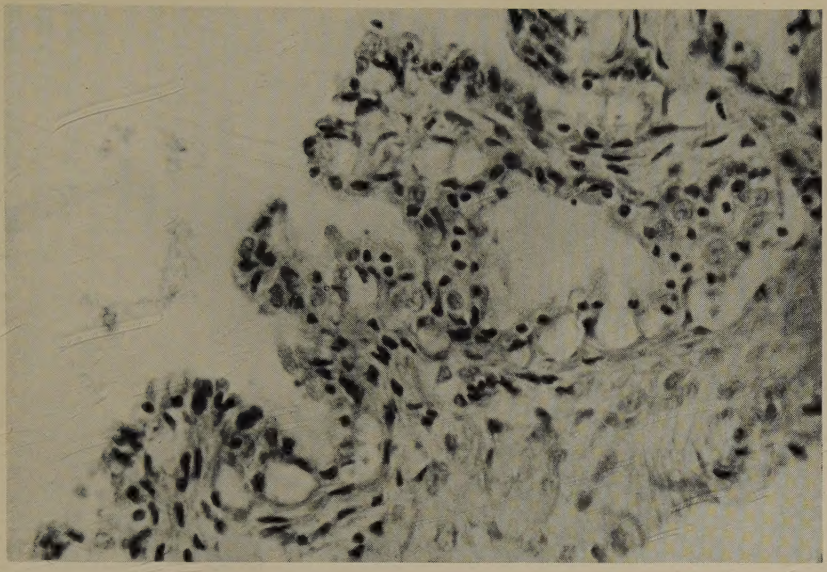


FIG. 9. EERSTE CHORIOALLANTOÏS-PASSAGE GESTYL.
De kernen van het epitheel zijn onderling verschillend van chromatine rijkdom. De kernen zijn ook niet alle van de zelfde vorm. Sommige zijn hoekig, andere rond. Onder deze oppervlakkige laag zien we vacuolevorming. De inhoud is iets troebel. De randen zijn rond, zodat we kunnen aannemen, dat de inhoud onder druk heeft gestaan. In het mesoderm zijn de cellen zeer verscheiden van vorm en de kernen zijn ook zeer licht van kleur, soms zeer vaag nog te zien. De kernen zijn wat blazig en tonen insluitlichaampjes.

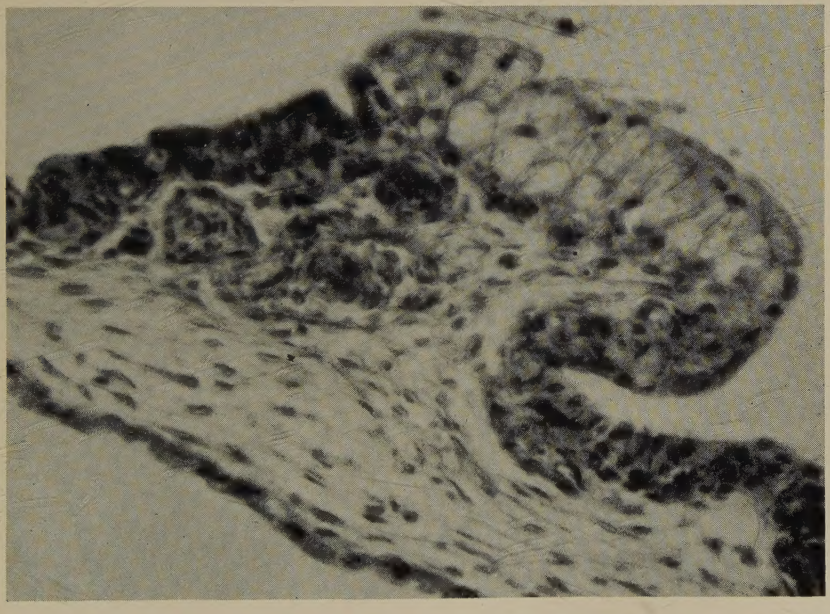


FIG. 10. EERSTE CHORIOALLANTOÏS-PASSAGE GESTYL.
Het normale epitheel gaat over in een stuk epitheel waarvan de cellen sterk vergroot zijn. Het cytoplasma is troebel met vacuolevorming aan de basis. De kernen liggen verdrongen naar de basis. Ze zijn klein en chromatinerijk. Het mesoderm toont onder de plaats van het afwijkende epitheel een vermeerdering van bindweefsel, dat hier en daar een afwijkende structuurvorming vertoont.